

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019246

International filing date: 22 December 2004 (22.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-435122
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

07.01.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 6 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 3 5 1 2 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 4 3 5 1 2 2]

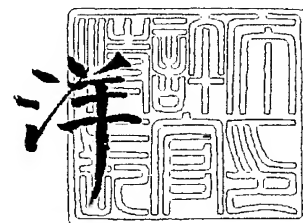
出 願 人 平 野 俊 夫
Applicant(s):



2 0 0 5 年 2 月 1 8 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 C1-A0325
【提出日】 平成15年12月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市住之江区安立 2 - 7 - 6
 【氏名】 平野 俊夫
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田 6 - 1 - 1 0 9
 【氏名】 山下 晋
【特許出願人】
 【住所又は居所】 大阪府大阪市住之江区安立 2 - 7 - 6
 【氏名又は名称】 平野 俊夫
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

下記 a) から d) のいずれかに記載の単離されたDNAであるSnail活性調節剤。

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載の配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA

【請求項 2】

下記 a) から d) のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクターであるSnail活性調節剤。

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA

【請求項 3】

下記 a) から d) のいずれかに記載のDNAによってコードされた、単離されたタンパク質であるSnail活性調節剤。

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 から配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA

【請求項 4】

配列番号 3 または配列番号 4 に記載する配列からなるDNAを標的配列としたアンチセンスオリゴヌクレオチドであるSnail活性抑制剤。

【請求項 5】

配列番号 3 または配列番号 4 に記載する配列からなるDNAの一部と同一または類似する配列を有する二本鎖RNAであるSnail活性抑制剤。

【請求項 6】

下記 a) から c) のいずれかに記載のヌクレオチドまたはベクターを有効成分とする、がんの治療用医薬品。

- a) 配列番号 3 に記載の配列からなるDNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド
- b) 配列番号 3 に記載する配列からなるDNAアンチセンスオリゴヌクレオチドが挿入されたベクター
- c) 配列番号 3 に記載する配列からなる一部と同一または類似する配列を有する二本鎖RNAであるオリゴヌクレオチド

【請求項 7】

請求項 4 または請求項 5 に記載したSnail活性抑制剤を有効成分とする、がんの治療用医薬品。

【請求項 8】

下記 a) または b) に記載の単離されたDNAである EMT 誘導剤。

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする DNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載の配列からなる DNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA
- d) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA

【請求項 9】

下記 a) から d) のいずれかに記載の DNA が挿入されたベクターである EMT 誘導剤。

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなる DNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA
- d) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA

【請求項 10】

下記 a) から d) のいずれかに記載の DNA によってコードされた、単離されたタンパク質である EMT 誘導剤。

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなる DNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードした DNA
- d) 配列番号 3 から配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA

【請求項 11】

配列番号 3 または配列番号 4 に記載する配列からなる DNA を標的配列としたアンチセンスオリゴヌクレオチドである EMT 抑制剤。

【請求項 12】

配列番号 3 または配列番号 4 に記載する配列からなる DNA の一部配列と同一または類似する配列を含む二本鎖 RNA である EMT 抑制剤。

【請求項 13】

請求項 11 または請求項 12 に記載した EMT 抑制剤を有効成分とする、がんの治療用医薬品。

【請求項 14】

Snail 活性抑制剤候補物質のスクリーニング方法であって、

- a) E-カドヘリンプロモーター制御下にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターと被験物質を 1 細胞段階の胚に注入する工程
- b) レポーター遺伝子の発現量を測定する工程
- c) 測定されたレポーター遺伝子発現量を、被験物質非存在下における測定量と比較して、低下または増加させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 15】

請求項 1 から請求項 3 のいずれかに記載の Snail 活性調節剤または請求項 8 から請求項 10 のいずれかに記載の EMT 誘導剤を有効成分とする創傷治癒剤

【請求項 16】

請求項 4 から請求項 5 のいずれかに記載のSnail活性抑制剤または請求項 11 から請求項 12 のいずれかに記載のEMT抑制剤を有効成分とする抗炎症剤

【請求項 17】

配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質を有効成分とする Zn 要求性タンパク質活性調節剤



【書類名】明細書

【発明の名称】EMT誘導剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、EMT（上皮間葉移行）制御におけるLIV1の利用に関する。

【背景技術】

【0002】

上皮間葉移行（EMT）は、胚発生、臓器や組織の再生、がん転移・進行における重要な事象の一つである。上皮間葉移行（epithelial-mesenchymal transition ;EMT）とは、原腸形成、創傷治癒およびがん進行などの過程において、上皮細胞が細胞-細胞接着系を弱めて分散し、間葉細胞としての侵襲性細胞挙動を示すようになる、細胞の表現型の移行をいう（非特許文献1）。発生やがんの転移・進行の理解のためには、EMTの機構解明が必要であるが、EMTについては、いまだ未知の部分も多い。

【0003】

このEMTについて、Snail及びSlugによる細胞-細胞接着系の変化との関連を示す証拠が幾つか報告されている。Snail及びSlugは、細胞-細胞接着系を変化させるジンクフィンガータンパク質である。Snailファミリータンパク質は、当初、ショウジョウバエ（*Drosophila*）の原腸形成過程において重要な役割を担う物質として報告された。最近になって、付着性結合に関与するE-カドヘリン、密着接着に関与するクローディンやオクルディン等の細胞-細胞接着分子の直接的転写レプレッサーとして重要視されてきている（非特許文献1-4）。Snail及びSlugは、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエル（*Xenopus*）、ゼブラフィッシュおよびショウジョウバエ（*Drosophila*）の胚において局在化パターンが類似しており、これらの胚においてSnailまたはSlug機能が失われると、原腸形成および／または神経堤移動過程が損なわれる（非特許文献1,5-7）。さらに、Snailの発現増加は、多くのヒトがんにおいて脱分化および転移能獲得と相関関係があるとされている。これらから、生理学的または病理学的in vivoのEMT過程において、snailおよびslugの潜在的役割は進化上保存されているということができる（非特許文献1）。しかしながら、発現したSnailの活性の調節機構はまだ明らかになっていない。

【0004】

一方、STAT（single transducer and activator of transcription）は、多様なサイトカインおよび成長因子に応答して生物学的作用を仲介する転写因子である（非特許文献8～10）。例えば、細胞の増殖、分化、生存等といった生物学的作用を仲介している。さらにSTATは、脊椎動物の原腸形成、創傷治癒、脊椎動物のがん進行及びショウジョウバエ（*Drosophila*）や細胞性粘菌（*Dictyostelium*）における類似過程での細胞運動に関与している（非特許文献11）。本発明者らは、先に、STAT3がゼブラフィッシュの原腸形成過程においてオーガナイザー中で活性化されること、STAT3活性は原腸形成運動にとって必須であるものの、初期の細胞発生運命特異性については必要とされないことを明らかにした。これらのSTAT3要求は、原腸オーガナイザー細胞の前方移動については細胞自律性であり、近隣細胞の収束については非細胞自律性である（非特許文献12）。また、ショウジョウバエ（*Drosophila*）の卵形成（非特許文献13）、細胞性粘菌（*Dictyostelium*）の化学走性（非特許文献14）およびマウスの皮膚創傷治癒過程（非特許文献15）で起こる境界細胞移動において、STATは細胞移動については必要とされるが、細胞増殖のためには必須ではない。加えて、多くのヒト癌において、STATファミリーメンバー、主にSTAT3の恒常的活性化が観察される。この事実は、上記STATファミリーメンバーが細胞の成長や生存に関与していることを意味している（非特許文献16）。しかし、細胞-細胞接着や癌細胞の細胞運動についてもSTAT3が影響を及ぼしている可能性も考えられる。上記知見から、EMTにおけるSTATシグナル伝達の役割が、これらの過程を通じて進化的に保存されている可能性は高い。しかしながら、EMTにおけるSTAT作用の分子機構の全体像はわかっていない。

【0005】

【非特許文献1】Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour p

regression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-54 (2002).

【非特許文献 2】Batlle, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-9 (2000).

【非特許文献 3】Cano, A. et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83 (2000).

【非特許文献 4】Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M. & Tsukita, S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 116, 1959-67 (2003).

【非特許文献 5】Leptin, M. twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5, 1568-76 (1991).

【非特許文献 6】Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. & Cooke, J. C. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-9 (1994).

【非特許文献 7】Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F. & Gridley, T. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21, 8184-8 (2001).

【非特許文献 8】Bromberg, J. & Darnell, J. E., Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19, 2468-73 (2000).

【非特許文献 9】Darnell, J. E., Jr. STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-5 (1997).

【非特許文献 10】Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19, 2548-56 (2000).

【非特許文献 11】Yamashita, S. & Hirano, T. in *Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs): Activation and Biology* (eds. Sehgal, P. B., Hirano, T. & Levy, D. E.) (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, in press).

【非特許文献 12】Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell* 2, 363-75 (2002).

【非特許文献 13】Silver, D. L. & Montell, D. J. Paracrine signaling through the JAK/STAT pathway activates invasive behavior of ovarian epithelial cells in *Drosophila*. *Cell* 107, 831-41 (2001).

【非特許文献 14】Mohanty, S. et al. Evidence that the Dictyostelium Dd-STAT protein is a repressor that regulates commitment to stalk cell differentiation and is also required for efficient chemotaxis. *Development* 126, 3391-405 (1999).

【非特許文献 15】Sano, S. et al. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *Embo J* 18, 4657-68 (1999).

【非特許文献 16】Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-88 (2000).

【非特許文献 17】Manning, D. L., Daly, R. J., Lord, P. G., Kelly, K. F. & Green, C. D. Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol* 59, 205-12 (1988).

【非特許文献 18】Manning, D. L. et al. Oestrogen-regulated genes in breast cancer: association of pLIV1 with lymph node involvement. *Eur J Cancer* 30A,

675-8 (1994).

【非特許文献 1 9】Taylor, K. M. & Nicholson, R. I. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta* 1611, 16-30 (2003).

【非特許文献 2 0】Taylor, K. M., Morgan, H. E., Johnson, A., Hadley, L. J. & Nicholson, R. I. Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J* 375, 51-9 (2003).

【非特許文献 2 1】Nasevicius, A. & Ekker, S. C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature* 26, 216-20 (2000).

【非特許文献 2 2】Kozlowski, D. J. & Weinberg, E. S. Photoactivatable (caged) fluorescein as a cell tracer for fate mapping in the zebrafish embryo. *Methods Mol Biol* 135, 349-55 (2000).

【非特許文献 2 3】Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T. F. & Postlethwait, J. H. Structure of the zebrafish snail gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* 119, 1203-15 (1993).

【非特許文献 2 4】Thisse, C., Thisse, B. & Postlethwait, J. H. Expression of snail2, a second member of the zebrafish snail family, in cephalic mesoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryos. *Dev Biol* 172, 86-99 (1995).

【非特許文献 2 5】Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L. & Driever, W. Transparent things: cell fates and cell movements during early embryogenesis of zebrafish. *Bioessays* 17, 931-9 (1995).

【非特許文献 2 6】Blanco, M. J. et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 21, 3241-6 (2002).

【非特許文献 2 7】Fujita, N. et al. MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* 113, 207-19 (2003).

【非特許文献 2 8】Peinado, H., Quintanilla, M. & Cano, A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278, 21113-23 (2003).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

本発明が解決しようとする課題は、EMT調節剤および癌の新規治療用医薬品を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 7】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、ゼブラフィッシュの胚を用いて、EMTにおいて重要な位置を占めると考えられるSTAT3の分子機構解明を試みた。本発明者らがSTAT3の標的遺伝子の単離を行ったところ、意外にも、STAT3標的遺伝子はLIV1であることが明らかになった。

【0 0 0 8】

そこで本発明者らは、LIV1について引き続き検討を行った。まず、LIV1遺伝子がゼブラフィッシュの原腸オーガナイザー細胞において発現することを明らかにした。次に、数種のゼブラフィッシュ胚においてLIV1遺伝子の発現を特異的に抑制させ、LIV1発現抑制が胚へ与える影響を検討した。その結果、ゼブラフィッシュ胚のLIV1活性を欠損させると、オーガナイザー細胞の移動度合いに支障を来すことがわかった。また、STAT3発現が阻害されたゼブラフィッシュ胚のオーガナイザー細胞においてLIV1遺伝子を発現させると、失われたSTAT3機能のうち、細胞自律性機能の欠損はLIV1遺伝子発現により救済される

が、非細胞自律性機能の欠損は救済されないことも明らかになった。さらに、本発明者らは、LIV1が、STAT3およびLIV1活性に独立に発現する亜鉛フィンガータンパク質Snailのレプレッサー活性を増強すること、そしてSnailが、EMTにおけるLIV1作用に必須であることを示した。これらの結果から、オーガナイザー細胞の前方移動におけるSTAT3の細胞自律性役割において、LIV1が必須かつ十分なSTAT3の標的遺伝子であることが導かれる。また、ゼブラフィッシュの胚での原腸オーガナイザー細胞のEMT過程において、STAT3、LIV1およびSnailの3つの分子に関連性があることが立証された。

【0009】

LIV1は、当初はエストロゲン制御を受ける乳癌タンパク質として同定された。がん転移拡大に関与することが知られていたが(非特許文献17、18)、最近になって、LIV1がLZT (ZIP亜鉛トランスポーターのLIV-1サブファミリー) と称されるZIP亜鉛トランスポーターサブファミリー (Zrt-、Irt様タンパク質) に属し(非特許文献19)、亜鉛トランスポーターとして機能することが明らかになった(非特許文献20)。

【0010】

上述の知見に基づき、本発明者らは、EMTの機構について、以下のモデルを構築するにいたった。亜鉛フィンガータンパク質Snailの発現は、TGF- β またはFGFを通してMAPKにより調節される(非特許文献28)。一方、STAT3による発現調節を受ける亜鉛トランスポーターLIV1は、亜鉛フィンガータンパク質Snailを活性化し、その結果として起こる細胞-細胞接着系の下方調節により、最終的にEMTを誘導する。上記EMT機構モデルを図5rに示す。

【0011】

LIV1およびSnailが、乳癌細胞の転移拡大に関与することが報告されている(非特許文献1, 18, 26, 27)。また、STAT3は乳癌を含む多くの腫瘍で構造的に活性化される。したがって、類似の機構は、癌進行に寄与する可能性がある(非特許文献16)。しかしこれまで、LIV1がin vivoでどのような役割を果たしているのか、また、癌細胞の転移において重要な位置を占めているのかどうか、ということについては、何ら知られていなかった。今回、本発明者らによって、LIV1がEMTに寄与し、さらには癌の転移へにも関与することが初めて明らかになった。すなわち、本発明者らは、癌の転移・進行に関連する上皮間葉移行(EMT)の機構を解明し、また、本発明である、EMT調節剤、癌の治療用医薬品等を提供した。本発明は、より具体的には以下のとおりである。

【0012】

(1) 下記a) からd) のいずれかに記載の単離されたDNAであるSnail活性調節剤

- a) 配列番号1または配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号3または配列番号4のいずれかに記載の配列からなるDNA
- c) 配列番号1または配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号3または配列番号4のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、

(2) 下記a) からd) のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクターであるSnail活性調節剤

- a) 配列番号1または配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号3または配列番号4のいずれかに記載する配列からなるDNA
- c) 配列番号1または配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号3または配列番号4のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、

(3) 下記 a) から d) のいずれかに記載のDNAによってコードされた、単離されたタンパク質であるSnail活性調節剤

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 から配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、

(4) 配列番号 3 または配列番号 4 に記載する配列からなるDNAを標的配列としたアンチセンスオリゴヌクレオチドであるSnail活性抑制剤

(5) 配列番号 3 または配列番号 4 に記載する配列からなるDNAの一部と同一または類似する配列を有する二本鎖RNAであるSnail活性抑制剤、

(6) 下記 a) から c) のいずれかに記載のヌクレオチドまたはベクターを有効成分とする

医薬品

- a) 配列番号 3 に記載の配列からなるDNAのアンチセンスオリゴヌクレオチド
- b) 配列番号 3 に記載する配列からなるDNAアンチセンスオリゴヌクレオチドが挿入されたベクター
- c) 配列番号 3 に記載する配列からなる一部と同一または類似する配列を有する二本鎖RNAであるオリゴヌクレオチド、

(7) 請求項 4 または請求項 5 に記載したSnail活性抑制剤を有効成分とする、がんの治療用医薬品、

(8) 下記 a) または b) に記載の単離されたDNAであるEMT誘導剤

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載の配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、

(9) 下記 a) から d) のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクターであるEMT誘導剤

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA、

(10) 下記 a) から d) のいずれかに記載のDNAによってコードされた、単離されたタンパク質であるEMT誘導剤

- a) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA
- b) 配列番号 3 または配列番号 4 のいずれかに記載する配列からなるDNA
- c) 配列番号 1 または配列番号 2 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしたDNA
- d) 配列番号 3 から配列番号 4 のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハ

イブリダイズするDNA、

(11) 配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNAを標的配列としたアンチセンスオリゴヌクレオチドであるEMT抑制剤、

(12) 配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNAの一部配列と同一または類似する配列を含む二本鎖RNAであるEMT抑制剤、

(13) 上記(11)または上記(12)に記載したEMT抑制剤を有効成分とする、がんの治療用医薬品

(14) Snail活性抑制剤候補物質のスクリーニング方法であって、

a) E-カドヘリンプロモーター制御下にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターと被験物質を1細胞段階の胚に注入する工程

b) レポーター遺伝子の発現量を測定する工程

c) 測定されたレポーター遺伝子発現量を、被験物質非存在下における測定量と比較して、低下または増加させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(15) 上記(1)から上記(3)のいずれかに記載のSnail活性調節剤または上記(8)から上記(10)のいずれかに記載のEMT誘導剤を有効成分とする創傷治癒剤、

(16) 上記(4)から上記(5)のいずれかに記載のSnail活性抑制剤または上記(11)から上記(12)のいずれかに記載のEMT抑制剤を有効成分とする抗炎症剤、

(17) 配列番号1または配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質を有効成分とするZn要求性タンパク質活性調節剤。

【発明の効果】

【0013】

本発明は、Snail活性調節剤、EMT誘導剤であるLIV1を提供する。本発明者らによって、STAT3の下流標的であるLIV1が、Snail活性に影響を及ぼすことを通じて、原腸形成体細胞のEMTにおける重要な役割を果たしていることが初めて立証された。したがって、本発明のSnail活性調節剤、EMT誘導剤は、発生を制御する物質として発生学の研究発展に寄与するだけでなく、再生医療において移植用臓器の再生促進剤として応用しうる。また、本発明はSnail活性抑制剤、EMT抑制剤をも提供する。EMTは癌の転移・進行に深く関わっており、これを抑制するSnail活性抑制剤、EMT抑制剤は、癌の転移・進行を防止すると考えられ、新たな癌治療用医薬品としての応用が見込まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、STAT3の下流標的であるLIV1に関する。上述のとおり、本発明者らによって、LIV1遺伝子の発現がSnail活性に影響を及ぼすことを通じてEMTを調節することが明らかになった。したがって、LIV1タンパク質はSnail活性調節、EMT調節を目的として利用することができる。

【0015】

本発明において、Snail活性調節剤とは、ジンクフィンガータンパク質Snailの活性を直接または間接的に正に調節し得る物質をいう。Snail活性調節剤は、Snail活性を調節することにより、細胞接着を変化させ、EMT (epithelial-mesenchymal transition ;EMT) を誘導し、あるいは、がんの転移・進行に影響を及ぼしうる。

【0016】

このようなSnail活性調節剤として利用可能な物質の好適な例として、配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる単離されたタンパク質LIV1を挙げることができる。タンパク質LIV1をコードするDNA配列として、配列番号3,4に記載した。また、このLIV1に類するタンパク質であれば、本願発明のSnail活性調節剤として利用することができる。

【0017】

本明細書において「単離した」とは、物質が本来の環境（たとえば自然に発生する物質であればその自然環境）から取り出されたことをいい、物質の環境状態が人為的に変えられたことを意味する。また「単離」とは、対象化合物が実質的に富む試料中に存在する化

化合物および／または対象化合物が部分的または実質的に精製されている試料中に存在する化合物を含むことを意味する。ここで「実質的に精製した」という用語は、その天然の環境から切り離されて、天然に関連している他の成分を少なくとも60%、好ましくは75%、および最も好ましくは90%含まないことを指す。

【0018】

上記LIV1タンパク質の調製は、当業者に周知の各種方法によって行うことが可能である。例えば、配列番号3または配列番号4に記載の塩基配列からなるDNAが挿入されたベクターを保持した形質転換体にタンパク質を生産させ、精製することによって調製できる。使用するベクターは、タンパク質生産に用いる翻訳系により、適宜選択することができる。また、LIV1は、乳房、前立腺、脳下垂体、脳などのホルモン系組織に発現することが知られている（非特許文献19）。抗LIV1タンパク質抗体を周知方法で調製し、該抗体でアフィニティカラムを作製すれば、LIV1を発現する細胞抽出物、例えば、ヒトやゼブラフィッシュ、上記ホルモン系組織の細胞抽出物からLIV1タンパク質を精製することができる。

【0019】

上記LIV1に類似するタンパク質は、Snail活性を調節し得るタンパク質であって、例として、配列番号1から配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質を挙げることができる。

【0020】

上記LIV1に類似するタンパク質の調製は、例えば、LIV1をコードする塩基配列を利用してハイブリダイゼーションを行い、得られた相同性の高いDNAによって形質転換体を作製し、該形質転換体に所望のタンパク質を生産させる方法をとることができる。相同性の高いDNAを得る方法の一例として、配列番号3または4に記載された塩基配列の一部をプローブとし、ヒトや、ヒト以外の脊椎動物の細胞等からストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする方法を挙げることができる。

【0021】

上記ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、当業者であれば、適宜選択することができる。一例を示せば、25%ホルムアミド、より厳しい条件では50%ホルムアミド、4×SSC、50mM Hepes pH7.0、10×デンハルト溶液、20μg/ml変性サケ精子DNAを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で一晩プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、42℃で一晩保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄における洗浄液および温度条件は、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」程度で、より厳しい条件としては「0.5×SSC、0.1% SDS、42℃」程度で、さらに厳しい条件としては「0.2×SSC、0.1% SDS、65℃」程度で実施することができる。このようにハイブリダイゼーションの洗浄の条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0022】

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは少なくとも95%以上、さらに好ましくは少なくとも97%以上（例えば、98から99%）の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれ

るプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【0023】

上記LIV1に類似するタンパク質の調製は、別の公知手段によることも可能である。例えば、エキソヌクレアーゼを用いるdeletion mutant作製法、カセット変異法等のsite-directed mutagenesisによってLIV1 DNAを人為的に改変させ、該改変LIV1 DNAを用いて、所望タンパク質を調製することができる。

【0024】

LIV1に類似するタンパク質として調製したタンパク質のSnail活性調節剤としての活性を確認するには、実施例記載のように、Snailタンパク質が接着分子E-カドヘリンの発現を抑制することを利用して、E-カドヘリン発現抑制活性を指標として判断することができる。

【0025】

Snail活性調節剤として利用可能な物質の別の好適な例として、配列番号3または配列番号4に記載の配列からなる単離されたDNAを挙げることができる。上記DNAはタンパク質LIV1をコードしており、細胞内に導入されればLIV1タンパク質発現を通じて間接的にSnail活性を調節し得る物質である。

【0026】

上記DNAは、配列番号3から配列番号4のいずれかに記載の配列の一部をプローブとし、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術によって、LIV1が発現している細胞のcDNAから調製することができる。また、配列番号3から配列番号4のいずれかに記載の配列の一部をプライマーとし、mRNAからRT-PCRを実施して得ることもができる。あるいは、市販のDNA合成機を用いて、人工的に合成してもよい。

【0027】

さらに、上記DNAに類似するDNAもまた、Snail活性調節剤の一例である。該類似するDNAとして、配列番号3から配列番号4のいずれかに記載する配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAであって、Snail活性を調節し得るタンパク質をコードしたDNAを挙げることができる。このDNAの調製法は、既に上述したとおりである。

【0028】

上述した各DNAを使用するときは、適当なベクターに挿入して用いることができる。ベクターに挿入したものも、また別のSnail活性調節剤の態様の一つである。使用するベクターは、目的に応じて適当な発現ベクターを選択することができる。具体的には、哺乳動物由来のベクター(例えば、pcDNA3(インビトロジェン社製)や、pEGF-BOS(Nucleic Acids Res., 18(17), p.5322, 1990)、pEF、pCDM8、pCXN、昆虫細胞由来のベクター(例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(インビトロジェン社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター(例えばpMH1、pMH2)、動物ウイルス由来のベクター(例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来のベクター(例えば、pZIPneo)、酵母由来のベクター(例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロジェン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来のベクター(例えば、pPL608、pKTH50)、大腸菌ベクター(M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script)、などが挙げることができる。本発明においては、哺乳動物細胞内で発現可能なベクターを用いることが好ましく、又、発現ベクターを用いることが好ましい。ベクターを細胞へ導入するには、例えば、リン酸カルシウム法(Virology, Vol.52, p.456, 1973)、DEAEデキストラン法、カチオンリポソームDOTAP(ロッシユ・ダイアグノスティックス社製)を用いた方法、エレクトロポレーション法(Nucleic Acids Res., Vol.15, p.1311, 1987)、リポフェクション法(J. Clin. Biochem. Nutr., Vol.7, p.175, 1989)、ウイルスにより感染導入方法(Sci. Am., p.34, 1994)、パーティクルガンなどから選択することにより行うことができ

る。

【0029】

上述の各種Snail活性調節剤は、直接または間接的に、ジンクフィンガータンパク質Snailの活性化を導く。さらに、Snail活性化はEMT誘導に寄与し、EMTは胚の原腸形成、臓器・組織の再生、癌の転移・進行に関連する。したがって、Snail活性調節剤は、発生過程の解明や癌の転移・進行機構の解明のために用いることができる。さらには再生医療における臓器・組織再生の促進剤として、有効に活用できると考えられる。また、細胞の再生を促進することから、創傷治癒剤としても応用可能である。

【0030】

本発明は、Snail活性抑制剤に関する。Snail活性の抑制は、Snailによる接着分子発現抑制を抑え、EMT誘導阻害、癌の転写・進行阻止につながる。

【0031】

Snail活性抑制剤の例として、LIV1をコードするDNAまたはmRNAを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを挙げることができる。本発明者らによって、LIV1がSnail活性を制御し得ることが明確になったことから、LIV1をコードするDNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、内在するLIV1遺伝子の発現を妨げ、Snail活性を負に制御すると考えられる。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNAまたは該DNAから生成されるmRNAを標的配列とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを挙げることができる。一例としては、配列番号5、配列番号6に記載するオリゴヌクレオチドを挙げることができる。これ以外にも、上記配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNA等のいずれかの箇所にハイブリダイズしLIV1の発現を有効に阻害できれば、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれ、上記配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNAまたは対応するmRNAと完全に相補的でなくてもよい。

【0032】

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、目的に応じ、適当なベクターに挿入して用いることができる。例えば、遺伝子治療に応用する目的であれば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター等のウイルスベクターや、カチオニックリポソーム、リガンドDNA複合体などの非ウイルスベクター等の中から、適宜選択可能である。また、キャリアを用いずに、裸のプラスミドDNA (naked pDNA) として大容量の水溶液とともに投与する方法をとることも考えられる。

【0033】

別のSnail活性抑制剤の例として、LIV1をコードするDNAの一部と同一または類似する配列を有する二本鎖RNAを挙げることができる。標的遺伝子配列と同一または類似した配列を有する二本鎖RNAは、標的遺伝子の発現が妨げるRNA干渉 (RNA interference, RNAi) を引き起こし得る。RNAiは、二本鎖RNA(dsRNA)を細胞内に導入した際に、そのRNA配列に対応する細胞内のmRNAが特異的に分解され、蛋白質として発現されなくなる現象をいう。二本鎖を形成する領域は、全ての領域において二本鎖を形成していてもよいし、一部の領域 (例えば両末端又は片方の末端など) が一本鎖等になっていてもよい。したがって、本発明の二本鎖RNAにおいても、二本鎖でない領域が含まれていてもよい。RNAiに用いられるオリゴRNAは10~100bpのRNAが用いられることが多く、通常19~23bpのRNAが用いられる。RNAi法は、Nature, Vol.391, p.806, 1998、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.95, p.15502, 1998、Nature, Vol.395, p.854, 1998、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.96, p.5049, 1999、Cell, Vol.95, p.1017, 1998、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.96, p.1451, 1999、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.95, p.13959, 1998、Nature Cell Biol., Vol.2, p.70, 2000等の記載に従って行うことができる。

【0034】

上記Snail活性抑制剤は、Snailと関連する発生学、腫瘍学の研究に用いることができるほか、負のSnail活性制御を通じて、がんの転移・進行を抑える治療薬として用いることができると考えられる。LIV1の発現が認められている組織のがんには有効と考えられ、特

に乳癌への効果が期待できる。また、細胞接着や細胞運動を抑制することから、炎症性細胞の浸潤、拡散を抑制することができ、抗炎症剤としても応用可能である。

【0035】

上記Snail活性抑制剤をがん治療目的で使用方法としては、遺伝子治療を一例として挙げることができる。遺伝子治療は、変異した遺伝子を補正することを目的に、外部から患者の細胞に正常な遺伝子を導入し、細胞の表現型を変化させることにより、病気の治療を行う方法である。又、遺伝子治療は、遺伝子病の治療のみならず、エイズや癌などの他の疾患に対しても有効であると考えられている。遺伝子治療は、生体に直接遺伝子を導入し、細胞に遺伝子を組み込む方法 (in vivo法) と、患者の細胞を採取し、体外で細胞に遺伝子を導入した後、該細胞を再度、患者に移植する方法 (ex vivo法) に分けられる。in vivo法遺伝子治療の場合、上記Snail活性抑制剤をそのままあるいはベクターに挿入し、筋肉注射、局所注射、塗布、吸入等の投与方法により生体へ導入することが可能と考えられる。

【0036】

本発明のタンパク質、DNA、オリゴヌクレオチドを医薬品とする場合は、該物質を直接投与するほか、公知の製剤化技術によって、製剤とすることができる。例えば、薬理学上許容される媒体や、安定剤などと組み合わせて製剤とすることができる。投与経路や投与量、投与方法は、治療目的や治療対象に合わせて適切なものを選択することができる。

【0037】

また、本発明は、EMT誘導剤を提供する。LIV1は上述のとおりSnailを活性化し、このSnail活性化によりEMTを誘導する。したがって上述したSnail活性調節剤は、EMT調節剤としても使用し得る。

【0038】

本発明において、EMT誘導剤とは、EMT (epithelial-mesenchymal transition ; EMT、上皮間葉移行) を直接または間接的に誘導し得る物質をいう。

【0039】

EMT誘導剤の例としては、配列番号1または配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる単離されたタンパク質LIV1、LIV1に類するタンパク質を挙げることができる。

【0040】

LIV1タンパク質の調製方法は上述のとおりである。

【0041】

上記LIV1に類似するタンパク質は、EMTを誘導し得るタンパク質であって、例として、配列番号1から配列番号2のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質を挙げることができる。

【0042】

調製方法は、Snail活性調節剤の欄で説明したとおりである。EMT誘導剤としての活性を確認するには、実施例のように、LIV1を特異的に抑制した胚に被験物質を注入し、被験物質の効果によって、細胞移動運動観察や形態学的観察を行う方法をとることができる。細胞移動運動や形態学的観察結果がLIV1を特異的に抑制していない胚と同様であればEMT誘導剤の効果の有すると考えることができる。

【0043】

EMT誘導剤として利用可能な物質の別の好適な例として、配列番号3または配列番号4のいずれかに記載の配列からなる単離されたDNAを挙げることができる。上記DNAはタンパク質LIV1をコードしており、細胞内に導入されればLIV1タンパク質発現を通じて間接的にEMTを誘導し得る物質である。さらに、上記DNAに類似するDNA、これらを挿入したベクターもEMT誘導剤として利用可能な物質である。調製法は上述のとおりである。

【0044】

EMTが胚の原腸形成、臓器・組織の再生、癌の転移・進行に関連することから、これらE

MT誘導剤は、発生過程の解明や癌の転移・進行機構の解明のために用いることができる。さらには細胞再生を促進することで、再生医療における臓器・組織再生の促進剤や創傷治療剤としても有効に活用できると考えられる。

【0045】

本発明は、EMT抑制剤に関する。EMT抑制は、EMT誘導阻害を通じて、癌の転写・進行阻止につながる。

【0046】

本発明者らによって、LIV1がEMTを誘導し得ることが明確になったことから、LIV1をコードするDNAまたはmRNAを標的配列とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、内在するLIV1遺伝子の発現を妨げ、EMTを抑制すると考えられる。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドとして、配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNAまたは該DNAから精製されるmRNAを標的配列とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを挙げることができる。一例として、配列番号5、配列番号6に記載するオリゴヌクレオチドを挙げるができる。これ以外にも、上記配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNA等のいずれかの箇所にハイブリダイズしLIV1の発現を有効に阻害できれば、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれ、上記配列番号3または配列番号4に記載する配列からなるDNA等と完全に相補的でなくてもよい。

【0047】

また、LIV1をコードするDNAの一部と同一または類似する配列を有する二本鎖RNAもEMT抑制剤の一例である。

【0048】

LIV1抑制剤の使用態様は、Snail活性抑制剤と同様である。

【0049】

本発明は、Snail活性抑制剤候補物質のスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング方法は、E-カドヘリンプロモーター制御下にレポーター遺伝子が機能的に結合されたベクターと被験物質を1細胞段階の胚に注入する工程、レポーター遺伝子の発現量を測定する工程、測定されたレポーター遺伝子発現量を、被験物質非存在下における測定量と比較して、低下または増加させる化合物を選択する工程を含む。

【0050】

本発明に用いるレポーター遺伝子は、発現検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、ルシフェラーゼ、CAT遺伝子、 β ガラクトシダーゼ等を用いることができる。

【0051】

本スクリーニングの被験試料としては、遺伝子ライブラリー発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物等を例として考えられる。

【0052】

また本発明は、Zn要求性タンパク質活性調節剤に関する。前述のとおりLIV1タンパク質は亜鉛トランスポーターであり、Snailのみならず、他のZn（亜鉛）要求性タンパク質の活性も調節していると考えられる。したがって、LIV1はZn要求性タンパク質活性調節剤としての利用が見込まれる。本発明のZn要求性タンパク質活性調節剤は、Zn要求性タンパク質が関与する分子機構解明研究用としての用途があるとともに、免疫調節剤として利用できる可能性がある。

【実施例】

【0053】

[実施例1] STAT3標的遺伝子の同定

原腸形成に関与するSTAT3の分子機構解明のため、STAT3の下流標的遺伝子の同定を試みた。まず、原腸オーガナイザー中のSTAT3により誘導される遺伝子を単離するために、正常な胚およびSTAT3モルファント胚を使用して、サブトラクションスクリーニングを行った。

【0054】

モルファント胚とは、モルホリノによって特定の遺伝子の発現が十分に阻害された胚を

いう。本実施例では、STAT3遺伝子の発現が阻害されたモルファント胚を作成した。モルファント胚作製のため、STAT3-モルホリノヌクレオチド (STAT3-MO) を二種類用意した。また、対照として、STAT3-MOに変異を加えたSTAT3D4-MOも準備した。上記モルホリノオリゴヌクレオチドの作製はGENE TOOLS社に作製を依頼した。上記モルホリノオリゴヌクレオチドの配列を示す。

STAT3-MO:

5' -CTCAAGGTTTCAGATAAATCGTCCT-3' (配列番号 9)

5' -GCCATGTTGACCCCTTAATGTGTCG-3' (配列番号 10)

STAT3D4-MO:

5' -CTCtAGGaTTCAGATAAAaCGTgCT-3' (配列番号 11)

5' -GCCtGTaGACCCCTTAAaGTGaCG-3' (配列番号 12)

2種類のSTAT3-MOを1細胞段階の胚の卵黄に等量ずつ注入してモルホリノ胚 (STAT3-MO注入) を調製した。同様に、コントロールの胚 (STAT3D4-MO注入) を調製した。

【0055】

STAT3-MOを注入した中期原腸段階の胚およびSTAT3D4-MOを注入した中期原腸段階の胚からポリA⁺ RNAを分離した。サブトラクションスクリーニングはPCR-SelectTM cDNAサブトラクションキット (クロンテック (Clontech)) を用い、製造業者のプロトコールに従って実施した。

【0056】

上記サブトラクションスクリーニングによって単離したcDNAの配列を定法により決定し、データベースで検索した。本発明者らが単離したcDNAのうち、意外なことに、一つはゼブラフィッシュLIV1 (LZT-Zf3; 配列番号 3) であることが判明した。LIV1の推定アミノ酸配列およびLIV1タンパク質ドメインを配列番号 1 と図1aに示す。この配列は、長い細胞外N末端、短い細胞外C末端、TMIIIとTMIVの間の細胞質ループ内の長い可変領域、TM IV中にHNFモチーフ、TM V中にHEXPHEモチーフ、および膨大なヒスチジンリッチのリピートを有する8個の膜貫通ドメイン (TM) を含むことから、亜鉛トランスポーターのZIPファミリーとして位置づけられる (Taylor, K. M. & Nicholson, R. I. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta* 1611, 16-30 (2003).)。系統樹およびZIPトランスポーターのLZTサブファミリーの膜貫通ドメインIVおよびVにわたるアラインメントから、上記cDNAが、ヒトLIV1のゼブラフィッシュ対応物 (ホモログ) であることが明らかになった (LZT-Hs3; 図1b)。本発明者らによって、脊索前中内胚葉細胞において、STAT3が活性化されることがわかっている (Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell* 2, 363-75 (2002).)。

【0057】

上記知見を受けて、ゼブラフィッシュの原腸段階の胚におけるLIV1 mRNAの発現をWISH法で確認した。

Whole-Mount in situハイブリダイゼーション (WISH法) は、LIV1 mRNAに対するプローブとしてゼブラフィッシュLIV1 cDNA配列 (配列番号 1) を用い、基本的には、既報の方法 (Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell* 2, 363-75 (2002).) に従って実施した。

【0058】

ゼブラフィッシュLIV1 mRNAが母性的に発現し、そして、胚性転写物がシールド段階で増大してSTAT3が活性化される中内胚葉細胞に蓄積することが明らかになった (図1c-h)。原腸オーガナイザーでのLIV1 mRNAの発現は、STAT3モルファント胚で完全に消滅し、LIV1がSTAT3の下流標的であることが示された (図1i, j)。

【0059】

[実施例 2] 早期胚におけるLIV1機能の検討

ゼブラフィッシュ原腸形成過程におけるLIV1の早期胚での役割を検討するため、特異的翻訳阻害剤 (非特許文献 21 Nasevicius, A. & Ekker, S. C. Effective targeted gene

'knockdown' in zebrafish. Nat Genet 26, 216-20 (2000).)であるLIV1アンチセンス・モルホリノ (LIV1-MO) を使用してLIV1活性を欠く胚を作製し、LIV1 活性欠損の影響を観察した。LIV1-MOおよびコントロールのオリゴヌクレオチド配列を以下に示す。

LIV1-MO:

5' -CGGAAACAGCGCGAGTGTCTTTTGT-3' (配列番号 5)

5' -ACCGTGTGCAAAGAAACGTCATCAT-3' (配列番号 6)

LIV1D4-MO (LIV1アンチセンス・モルホリンの配列に変異を加えたコントロール):

5' -CGcAAAaAGCGaGAGTGTaTTaTGT-3' (配列番号 7)

5' -AcgGTcTGCAAAcAAACGTgATgAT-3' (配列番号 8)

【0060】

なお、これらモルホリノオリゴヌクレオチドを用いたモルホリノ胚の作製は、上述したSTAT3のモルホリノ胚の作製と同様に行った。

【0061】

LIV1-MOを注入した胚では、原腸形成の終期および後期段階に、頭部が誤って配置され、前後軸が短縮されているのが確認された。一方、対照LIV1D4-MOの注入の場合は、表現型の明確な変化は何ら確認されなかった(図2a-d)。LIV1-MOを注入したゼブラフィッシュ胚では、中軸最前方中内胚葉(ポルスター)および前方外胚葉構造は肉眼で観察できたが、動物極における本来の位置と比較して、植物側に45度までの間で転置していた。さらに、LIV1-MOを注入したゼブラフィッシュ胚では、中軸胚盤葉下層(脊索および体節)が形成されたが、本来より短縮し、分厚くなっていた。このことは、巻き込み運動、覆い被せ運動、および背側収束運動は正常であったのに対し、中軸中内胚葉の前方への運動がひどく阻害されたことを意味する。これと一致して、LIV1-MO注入胚での胚環(周縁細胞の巻き込み運動によって形成される中内胚葉の胚盤葉下層)および胚性シールド(背側周縁での肥厚、原腸オーガナイザー)は、シールド段階で明白であった(データは示さず)。これらの結果は共に、LIV1枯渇ゼブラフィッシュ胚が、原腸形成過程を通じて中内胚葉、オーガナイザー、および背側-腹側および前方-後方極性を形成する能力、および巻き込み運動、覆い被せ運動、および背側収束運動を開始する能力を維持することを示す。しかし、LIV1-MO注入胚中では、中軸中内胚葉細胞は前方に移動せず、頭部配置および前後軸伸長の障害を来した。

【0062】

次に、マーカー遺伝子の発現をWISH法で確認した。マーカーは、six3, pax2, goosecoi d, no tail, axial, papcを使用した。

【0063】

この結果からも、LIV1機能の喪失に関連した形態学的異常に関する証拠が得られた(図2e-v)。前脳(six3)、中脳-菱脳束(pax2)、前方の中軸中胚葉(goosecoi d)、後方の中軸中胚葉(no tailおよびaxial)、沿軸中胚葉(papc)、および内胚葉(axial)のマーカーが後期原腸段階にあるLIV1-MO注入胚で発現したが、これらマーカー遺伝子の発現ドメインは、植物極側に誤って配置された。また、前後軸構造の短縮、内外方向への僅かな伸長がLIV1-MO注入胚で確認された。後期原腸段階のLIV1欠損胚において予定運命特異性および領域化が正常であったことと一致して、上記中内胚葉遺伝子の正常な発現が発生初期段階で観察された(データは示されず)。これらの結果は、LIV1は、中内胚葉細胞の初期細胞運命特異性を明らかに変えることなく、細胞運動に影響を及ぼすことによって、原腸形成過程に不可欠な役割を果たしていることを示す。

【0064】

〔実施例3〕原腸形成過程におけるLIV1機能の検討

原腸形成過程における細胞運動にLIV1が与える影響について、さらに検討するために、4, 5-ジメトキシ-2-ニトロベンジル(DMNB)でケージしたフルオレセイン・デキストラン(Kozlowski, D. J. & Weinberg, E. S. Photoactivatable (caged) fluorescein as a cell tracer for fate mapping in the zebrafish embryo. Methods Mol Biol 135, 349-55 (2000).)を使用して、ゼブラフィッシュ胚での細胞追跡実験を行った(図3a-f)。

【0065】

細胞追跡実験は、基本的には既に報告されている方法(Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. Dev Cell 2, 363-75 (2002).)に従って実施した。すなわち、10ngのLIV1D4-MOまたはLIV1-MOを先に注入された1細胞段階にある胚の卵黄細胞に、100p μ lの0.5%DMNBケージドフルオレセイン-デキストラン(分子量10,000、モレキュラー・プローブズ(Molecular Probes))を注入した。シールド段階でケージ解除するため、DAPIフィルターセットを用いて発生させた紫外光ビーム($\lambda < 360\text{nm}$)を、背側または側部の胚盤葉周縁に1秒間照射し、胚性シールド中の細胞を標識し、原腸形成過程における標識細胞の配置を追跡した。

【0066】

対照LIV1D4-MO注入胚(図3a)では、標識細胞は、先の報告(Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. Dev Cell 2, 363-75 (2002).)と同様に、原腸形成終期に背側の中軸胚盤葉下層にAP軸構造の全長に沿って分配された。対照的に、LIV1-MO注入胚(図3b)では、標識細胞の前方運動が乱れ、結果的に中軸中内胚葉は短縮された。背側収束運動を監視するために、背側の胚性シールドから90度にあたる側部胚盤葉周縁の細胞を、シールド段階で標識した。原腸形成の過程で、LIV1-MO注入胚中の標識細胞は背側および前方に移動し、対照LIV1D4-MO注入胚(図3d, e)と同様に、原腸形成終期において前後軸構造に沿って伸長した。これら結果から、LIV1はオーガナイザー細胞が活発に移動するためには必須であるが、非中軸中胚葉細胞の背側収束には必須でないことが明確になった。

【0067】

上述知見から、LIV1がSTAT3の必須標的遺伝子の1つであること、LIV1はSTAT3の細胞自律的役割には必要とされるがSTAT3の非細胞自律的役割には必要とされないことが示唆される。もし事実であれば、LIV1は、オーガナイザー細胞の活発な移動において、細胞自律的に機能するに違いないと推測される。

【0068】

上記推測を確認するため移植実験を行った。移植実験は、既に報告されている方法(Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. Dev Cell 2, 363-75 (2002).)に従って行った。具体的には、ドナー胚は、1細胞段階にある卵黄細胞に、100p μ lの0.5%ロダミン-デキストラン(分子量10,000、モレキュラー・プローブズ)と共に、または100p μ lの0.5%蛍光-デキストラン(分子量10,000、モレキュラー・プローブズ)および10ngの所定のモルホリンと共に注入して作製した。ドナー胚の胚性シールドから得られる小集合の深細胞(10~30個細胞)を、同じ発生段階にある宿主胚の胚性シールドに移植した。また、プラスミドpCS2+ゼブラフィッシュLIV1(NotI, SP6)を線状化してセンス鎖キャップmRNAを調製し、細胞注入用として用いた。

【0069】

まずLIV1-MO注入ドナー胚またはLIV1D4-MO注入対照ドナー胚の胚性シールドから脊索前方の中内胚葉細胞を取得し、正常な宿主胚またはLIV1枯渇(LIV-1 depleted)胚の胚性シールドに共移植し、細胞追跡を行った(図4a-e)。脊索前中内胚葉細胞は、対照ドナー由来であってLIV1枯渇ドナー由来ではない移植細胞の場合、正常(図4b)またはLIV1枯渇宿主胚(図4d)のいずれかで、動物極より前方に移動した。LIV1-MO注入細胞の場合は、前方への移動が減少するが、LIV1枯渇ドナー細胞にLIV1mRNAを同時注入することによって、正常な対照宿主(図4c)またはLIV1消耗宿主(図4e)のいずれかにおいて救済された。上記結果は、脊索前中内胚葉の前方移動において、LIV1が自律的に細胞に作用することが示している。

【0070】

〔実施例4〕STAT3役割に対するLIV1の関係の検討

次に、脊索前中内胚葉細胞が前方へ移動するにあたり、該細胞のSTAT3が枯渇された場合に、STAT3枯渇により損なわれた機能をLIV1が十分に回復させることができるか検討した。移植実験および細胞追跡実験を行った。注入用のSTAT3 mRNAは、pCS2+ゼブラフィッ

シュSTAT3 (NotI, SP6) (Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. Dev Cell 2, 363-75 (2002).)を線状化して調製した。

【0071】

図4fに示すとおり、STAT3枯渇細胞胚性シールドに移植したとき、該STAT3枯渇細胞は動物極より前方には移動しなかった。この機能不全は、STAT3 mRNAを同時に注入することによって救済されるが(図4g)、STAT5mRNA(図4h)の同時注入では救済されなかった。本実施例において得られた結果において最も重要なのは、LIV1mRNAがSTAT3枯渇細胞の欠陥を救済したことである(図4i)。これらの結果は、STAT3枯渇胚における脊索前中内胚葉細胞の前方移動の機能回復にとって、LIV1が十分機能することを明確に示している。

【0072】

上記知見から推定されるLIV1の拘束は、LIV1mRNAは、シールド細胞におけるSTAT3の非細胞自律的役割の機能不全、すなわち収束誘導機能の機能不全を救済することはできないという、以下の細胞追跡実験結果から、さらに明確なものとなった。

【0073】

STAT3モルホリノおよび所定のmRNA注入ドナーから得られる脊索前方の中内胚葉細胞を、シールド領域に移植し、STAT3モルホリノおよび封鎖FITCを同時注入した宿主における側部の中内胚葉細胞を、初期原腸段階でUV指向性ケージ解除によって標識した。図4n-rに示すように、STAT3枯渇宿主胚に見られる収束の減少は、STAT3mRNA注入STAT3消耗ドナー由来の脊索前中内胚葉細胞をシールド領域へ移植することにより救済されたが(図4p)、LIV1mRNA注入STAT3消耗ドナー由来細胞の移植では救済されなかった(図4r)。

【0074】

全てのデータは、LIV1がSTAT3の細胞自律的役割に必須かつ十分な標的遺伝子であること、しかし非細胞自律的役割にとっては本質的ではないことを立証した。LIV1は、STAT3活性によって調節されるオーガナイザー細胞のEMTにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

【0075】

〔実施例5〕LIV1によるオーガナイザー細胞EMT誘導とSnailとの関係についての検討

上述のとおり、LIV1が原腸オーガナイザー細胞のEMTを誘導することが明らかになった。そこで、このLIV1によるオーガナイザー細胞EMTの誘導過程において、LIV1がSnailの発現および/またはSnailの活性に対し影響を与えているかどうかを検討した。

【0076】

まず、Snail活性への影響を検討するため、LIV1枯渇胚、STAT3枯渇胚およびSnail枯渇胚の原腸形成終期の表現型及び各胚オーガナイザー細胞の移動挙動を観察した(図5a-h)。LIV1枯渇胚、STAT3枯渇胚の調製は、上述のとおりである。Snail枯渇胚調製に用いたSnail-MOの配列を示す。

5' -GTCCACTCCAGTTACTTTCAGGGAT-3' (配列番号13)

5' -CATGCTGAAGTCTGAAGTTGATC-3' (配列番号14)

【0077】

正常胚のオーガナイザー細胞は、原腸形成の過程において、細胞-細胞接着系を積極的に弱め、自らの領域近隣を離れて個々に移動し、結果的に、体軸は原腸形成終期において前方に十分に伸長した(図5a、e)。しかしLIV1枯渇胚においては、オーガナイザー細胞は会合を弱めることができず、その結果、オーガナイザー細胞の移動は激しく乱れ、頭部は誤って配置され、短縮された前後軸構造が形成された(図5b、f)。オーガナイザー細胞の移動挙動および体軸伸長における同様の欠陥は、STAT3枯渇胚(図5c、g)およびSnail枯渇胚(図5d、h)においても観察された。このオーガナイザー細胞の挙動異常は、LIV1枯渇胚では、Snail1枯渇胚の場合と同様、オーガナイザー細胞のEMTがひどく乱れるということを明確に示した。

【0078】

次に、Snail発現についての検討を行った。注入に使用したSnail1 mRNAは、pCS2+マウスSnail (NotI, SP6) (Yamashita, S. et al. Stat3 Controls Cell Movements during Z

ebrafish Gastrulation. Dev Cell 2, 363-75 (2002).)を線状化して調製した。LIV1 mRNAおよびSnail1 mRNAは、それぞれ、Snail1-MO注入胚およびLIV1-MO注入胚において正常に発現した(図5i-p)。

【0079】

これらの結果は、LIV1およびSnail1が、原腸形成の過程においてEMTにとって必須であること、LIV1およびSnail1の発現は原腸オーガナイザー細胞で相互に独立して調節されることを示す。一方、Snail1枯渇オーガナイザー細胞の前方移動の細胞自律的欠陥は、LIV1 mRNAの同時注入によって救済することはできず(図4l)、逆も同じであった(データは示されず)。この結果は、LIV1はSnail活性に影響を及ぼしうることを示唆した。

【0080】

この問題を検証するため、Snail-応答性レポータープラスミド(Batlle, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol 2, 84-9 (2000).)を利用して、Snailのレプレッサー活性におけるLIV1の効果をレポーター分析によって試験した(図5q)。

【0081】

レポーター分析は、基本的には、既に報告されている方法(Batlle, E. et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol 2, 84-9 (2000).)に従って実施した。具体的には、-178から+92ヒトE-カドヘリンプロモーター制御下にLuc遺伝子が配置されたpGL3ベクターpGL3-E-cadhプロモーター(胚あたり2.5pg)、及びコントロールレポーターベクター(pRLtk)(胚あたり0.5g)を、及びコントロールレポーターベクター(pRLtk)(胚あたり1,10,100pg)、マウスSnail(胚あたり1,10,100pg)、ゼブラフィッシュSnail1モルホリノ(胚あたり10pg)と共に/または無しで、1細胞段階の胚に注入した。シールド段階(6hpf)にある二重ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ・システム(プロメガ(Promega))を使用し、製造業者の指示に従って、ホタル・ルシフェラーゼ(Luc)およびレニラ・レニホルミス(Renilla reniformis)ルシフェラーゼ(Rluc)活性を測定した。全ての場合において、Luc活性は、Rluc活性により標準化した。

【0082】

ゼブラフィッシュ胚にレポータープラスミドと共にSnail RNAを注入すると、Snail RNA用量依存的にレポータープラスミドからの転写が抑制された(図5q、レーン1~4)。対照的に、ゼブラフィッシュ胚へのSnail-MOの注入によって、レポータープラスミドからの転写が増強された(図5q、レーン5)。同様に、LIV1 RNAは、用量依存的にレポータープラスミドからの転写を抑制した(図5q、レーン6~8)。さらに、少ない一定量のSnail RNAと量を変化させたLIV1 RNAを同時に注入すると、LIV1 RNA用量依存的に、Snailのレプレッサー活性が増強された(図5q、レーン9~11)。

【0083】

LIV1が亜鉛トランスポータータンパク質であることから、LIV1が亜鉛フィンガータンパク質Snailの活性を調節している可能性は高いといえる。これが事実であれば、LIV1によるレポーター抑制は、Snail特異的な翻訳阻害剤に感受性があると考えられる。図5qに示すとおり、LIV1の活性は、Snail1-MO注入ゼブラフィッシュ胚において完全に消滅した(図5q、レーン12~14)。また細胞追跡実験においても、STAT3枯渇オーガナイザー細胞での前方移動欠陥がLIV1によって細胞自律的に救済される現象は、Snail-MOに感受性があった(図4i、m)。これらの結果は、表現型および遺伝子発現分析(図5a-p)の結果とともに、LIV1がゼブラフィッシュ原腸形成の過程においてSnailを活性化し、オーガナイザー細胞のEMTを誘導するという証拠を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】 a) ゼブラフィッシュLIV1タンパク質の略図表現および推定アミノ酸配列を示す図である。推定された8個の膜貫通ドメイン(図中(3))、CPALLYモチーフ(図中

(2) およびヒスチジン富反復 (図中(1)) の位置を示す。ローマ数字は、膜貫通ドメインを示す。アミノ酸配列中の括弧数字で示された下線部分は、タンパク質略図中の該当する括弧数字で示される領域に相当する。b) ゼブラフィッシュLIV1 (LZT-Zf3) およびZIPトランスポータータンパク質のヒトLZTサブファミリー (LZT-H) の比較を示す図である。配列は、膜貫通ドメインIVおよびVに渡り、そして、保存HNFモチーフおよびHEXPHEモチーフを含む。ゼブラフィッシュLIV1タンパク質と一致するアミノ酸は、強調 (黒) されている。c-j、正常な胚 (c-h)、STAT3D4対照モルホリノ注入胚 (i)、およびSTAT3モルホリノ注入胚 (j) での原腸段階にあるゼブラフィッシュLIV1mRNAの発現。c-e、i、j、側面図; f、h、動物極面図; g、背面図。背面は、c-f、iおよびjでは右側にある。

【図2】 a) - d) 受精1日後 (a、b、側面図、左手に前方) および原腸形成終期 (c、d、側面図、右手に背側) の表現型を示す図である。c、dでの矢印は、胚盤葉下層の前方限界に場所 (ポルスター) を記す。矢じりは、胚盤葉下層の後方限界に場所 (尾芽) を示す。e) - v) 各マーカーの発現を示す図である。パネルe-hおよびk-pは、1体節段階で、右手に背側の側面図を示す。パネルi-jおよびs-vは、1体節段階で、背面図を示す。パネルqおよびrは、1体節段階で、動物極面図を示す。

【図3】 細胞追跡実験の結果を示す図である。正常な対照胚 (a)、およびLIV1消耗胚 (b) での中軸中内胚葉細胞。正常な対照胚 (d)、およびLIV1消耗胚 (e) における側部中内胚葉細胞。a、b、dおよびeでは、上方に動物極、右手に背側。c)、f) グラフは、対照胚 (LIV1D4-MO)、LIV1消耗胚 (LIV1-MO)、およびStat3消耗胚 (Stat3-MO) における標識細胞群の前方移動 (c) および背側集中 (f) を比較する。矢印は、先方移動する中軸中内胚葉細胞の最先端 (c)、および側部の中内胚葉細胞を集中する背側 (f) を示し、矢尻は、シールド段階での開始位置を示す。

【図4】 a) 細胞移植実験を説明する図である。b) - m) 所定のモルホリノ (黒) およびmRNAを注入したドナーから得られた脊索前中内胚葉細胞 (緑または赤) を早期原腸段階にある所定のモルホリノ注入宿主のシールド領域に移植したときの、細胞移動を示す図である。全てのパネルは、原腸形成の終わりにある移植宿主胚を示す。各パネル最上段および中段の記載はドナーを、最下段の記載はホストを説明する。矢尻は当初の移植位置を示し、矢印は先方移動する移植細胞の最先端を示す。点線矢印は最上段記載のドナー、実線矢印は中段記載ドナーの細胞移動結果である。n) 細胞追跡実験の説明図である。o) - r) 原腸形成終期に脊索前中内胚葉細胞 (ドナー、実線矢印で示された囲み部分) を移植された宿主における側部中内胚葉細胞 (ホスト、点線矢印で示された囲み部分) を示す図である。矢印は、当初の位置から背側に収束する標識細胞の最先端を示す。

【図5】 a) - d) 原腸形成終期に各モルホリノオリゴヌクレオチドを注入した胚の表現型 (側面図、右手に背側) を示す図である。LIV1D4対照モルホリノ注入 (a)、LIV1モルホリノ注入 (b)、STAT3モルホリノ注入 (c)、およびSnail1モルホリノ注入 (d)。矢印は、胚盤葉下層の前方限界をあらわす。e) - h) 各胚における中期原腸段階での胚盤葉下層の最前方限界に存在するオーガナイザー細胞の形態を示す図である。対照 (e)、LIV1モルファント (f)、STAT3モルファント (g)、およびSnail1モルファント (h)。i) - p) 各胚における初期原腸段階 (6hpf) でのLIV1 (i-l) およびSnail1 (m-p) の発現を示す図である。対照 (i、m)、LIV1モルファント (j、n)、STAT3モルファント (k、o)、およびSnail1モルファント (l、p)。iからpの全パネルは、動物極面図を示す。q) Snail依存性LIV1活性を、E-カドヘリンプロモーター活性を指標として表した図である。ゼブラフィッシュLIV1 RNA (1、10または100pg/胚、レーン6~14)、マウスSnail RNA (1、10または100pg/胚、レーン2~4、9~11)、および/またはゼブラフィッシュSnail1モルホリノ (10ng/胚、レーン5、12~14)。r) EMTにおけるLIV1およびSnailの間の相互作用のモデルを示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> EMT INDUCER

<130> C1-A0325

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 742

<212> PRT

<213> Danio rerio

<400> 1

Met	Met	Thr	Phe	Leu	Cys	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Arg	Ala	Ser	Gly	Val
1				5					10					15	

Glu	Cys	Arg	Ile	Ala	Ala	Glu	Arg	Ala	Tyr	Phe	Arg	Val	Arg	Gly	Leu
			20					25					30		

Pro	Val	Ala	Asn	Met	Ile	Gly	Trp	Trp	Pro	Arg	Leu	Cys	Pro	Val	Met
		35					40					45			

Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Trp	Ala	Cys	Ser	Val	Gly	Ala	Gly	Ser	Asp	Cys
	50					55					60				

Lys	Ser	Val	Ala	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	Arg	Ile	Ala	Glu	Gln	Thr	Gln
65					70					75					80

Gln	Arg	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Phe	Asp	Lys	Tyr	Gly	Gln	Asn	Gly	Ser
			85						90					95	

Ile	Ser	Leu	Glu	Gly	Leu	Phe	Asn	Leu	Leu	Lys	Gly	Val	Gly	Leu	Asp
			100					105					110		

Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Met	Val	His	His	Pro	Gly	Asn	Ala	His	Asn	His
		115						120				125			

Thr	His	Thr	His	Asp	His	Thr	His	Thr	His	Val	Asp	Lys	Leu	Thr	Ala
		130				135					140				

His	Thr	His	Pro	Val	Thr	Thr	Lys	Lys	Gly	Asp	Met	Asp	His	Ser	Val
145					150					155					160

Glu	Lys	Ser	Asp	Pro	Val	Pro	Lys	Ala	Gln	Pro	Asp	Pro	Ala	Ser	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

出証特 2 0 0 5 - 3 0 1 2 1 5 8

Thr Gly Leu Thr Ala Leu Ser Gly Val Tyr Ile Met Phe Leu Ile Glu
 435 440 445
 His Phe Leu Thr Leu Gly Lys Met Tyr Lys Asp Lys Asn Gln Lys Val
 450 455 460
 Gln Lys Arg Val Asp Leu Thr Thr Glu Val Leu Glu Ser Glu Lys Leu
 465 470 475 480
 Pro Ser Leu Glu Glu Asn Asp Val Lys Ile Glu Ala Ala Glu Thr Asn
 485 490 495
 Gly Gly Arg Ala Leu Ala Glu Glu Glu Glu Val Met Leu Gly Ala Glu
 500 505 510
 Leu Tyr Asn Asp Ile Asp Cys Glu Asn Lys Cys His Ser His Phe His
 515 520 525
 Asp Thr Val Gly Gln Ser Asp Glu Gln His His His His His Asp Tyr
 530 535 540
 His His Ile Leu His His His His Ser Gln Asn His His Pro His Thr
 545 550 555 560
 His Thr His Arg His Thr His Ser Tyr Ser Gln Gln His Phe Glu Gln
 565 570 575
 Ala Gly Val Ala Thr Leu Ala Trp Met Val Ile Met Gly Asp Gly Leu
 580 585 590
 His Asn Phe Ser Asp Gly Leu Ala Ile Gly Ala Ala Phe Thr Glu Gly
 595 600 605
 Leu Ser Ser Gly Leu Ser Thr Ser Val Ala Val Phe Cys His Glu Leu
 610 615 620
 Pro His Glu Leu Gly Asp Phe Ala Val Leu Leu Lys Ala Gly Met Ser
 625 630 635 640
 Val Arg Gln Ala Met Leu Tyr Asn Leu Leu Ser Ala Leu Met Gly Tyr
 645 650 655
 Leu Gly Met Ile Ile Gly Ile Leu Ile Gly His Tyr Ala Glu Asn Val
 660 665 670
 Ala Thr Trp Ile Phe Ala Leu Thr Ala Gly Leu Phe Met Tyr Val Ala
 675 680 685
 Leu Val Asp Met Val Pro Glu Met Leu His Asn Asp Ala Ser Glu Ala
 690 695 700

Gly Phe Ser His Tyr Gly Phe Phe Leu Leu Gln Asn Ala Gly Ile Leu
705 710 715 720

Leu Gly Phe Gly Ile Met Leu Ile Ile Ala Val Phe Glu Asp Arg Ile
725 730 735

Gln Leu Asp Leu Gly Tyr
740

<210> 2
<211> 749
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ala Arg Lys Leu Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Phe Ala Leu Ser
1 5 10 15

Val Thr Asn Pro Leu His Glu Leu Lys Ala Ala Ala Phe Pro Gln Thr
20 25 30

Thr Glu Lys Ile Ser Pro Asn Trp Glu Ser Gly Ile Asn Val Asp Leu
35 40 45

Ala Ile Ser Thr Arg Gln Tyr His Leu Gln Gln Leu Phe Tyr Arg Tyr
50 55 60

Gly Glu Asn Asn Ser Leu Ser Val Glu Gly Phe Arg Lys Leu Leu Gln
65 70 75 80

Asn Ile Gly Ile Asp Lys Ile Lys Arg Ile His Ile His His Asp His
85 90 95

Asp His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Glu Arg His Ser
100 105 110

Asp His Glu His His Ser Asp His Glu His His Ser Asp His Asn His
115 120 125

Ala Ala Ser Gly Lys Asn Lys Arg Lys Ala Leu Cys Pro Asp His Asp
130 135 140

Ser Asp Ser Ser Gly Lys Asp Pro Arg Asn Ser Gln Gly Lys Gly Ala
145 150 155 160

His Arg Pro Glu His Ala Ser Gly Arg Arg Asn Val Lys Asp Ser Val
165 170 175

Ser Ala Ser Glu Val Thr Ser Thr Val Tyr Asn Thr Val Ser Glu Gly
 180 185 190
 Thr His Phe Leu Glu Thr Ile Glu Thr Pro Arg Pro Gly Lys Leu Phe
 195 200 205
 Pro Lys Asp Val Ser Ser Ser Thr Pro Pro Ser Val Thr Ser Lys Ser
 210 215 220
 Arg Val Ser Arg Leu Ala Gly Arg Lys Thr Asn Glu Ser Val Ser Glu
 225 230 235 240
 Pro Arg Lys Gly Phe Met Tyr Ser Arg Asn Thr Asn Glu Asn Pro Gln
 245 250 255
 Glu Cys Phe Asn Ala Ser Lys Leu Leu Thr Ser His Gly Met Gly Ile
 260 265 270
 Gln Val Pro Leu Asn Ala Thr Glu Phe Asn Tyr Leu Cys Pro Ala Ile
 275 280 285
 Ile Asn Gln Ile Asp Ala Arg Ser Cys Leu Ile His Thr Ser Glu Lys
 290 295 300
 Lys Ala Glu Ile Pro Pro Lys Thr Tyr Ser Leu Gln Ile Ala Trp Val
 305 310 315 320
 Gly Gly Phe Ile Ala Ile Ser Ile Ile Ser Phe Leu Ser Leu Leu Gly
 325 330 335
 Val Ile Leu Val Pro Leu Met Asn Arg Val Phe Phe Lys Phe Leu Leu
 340 345 350
 Ser Phe Leu Val Ala Leu Ala Val Gly Thr Leu Ser Gly Asp Ala Phe
 355 360 365
 Leu His Leu Leu Pro His Ser His Ala Ser His His His Ser His Ser
 370 375 380
 His Glu Glu Pro Ala Met Glu Met Lys Arg Gly Pro Leu Phe Ser His
 385 390 395 400
 Leu Ser Ser Gln Asn Ile Glu Glu Ser Ala Tyr Phe Asp Ser Thr Trp
 405 410 415
 Lys Gly Leu Thr Ala Leu Gly Gly Leu Tyr Phe Met Phe Leu Val Glu
 420 425 430
 His Val Leu Thr Leu Ile Lys Gln Phe Lys Asp Lys Lys Lys Lys Asn
 435 440 445

Gln Lys Lys Pro Glu Asn Asp Asp Asp Val Glu Ile Lys Lys Gln Leu
450 455 460

Ser Lys Tyr Glu Ser Gln Leu Ser Thr Asn Glu Glu Lys Val Asp Thr
465 470 475 480

Asp Asp Arg Thr Glu Gly Tyr Leu Arg Ala Asp Ser Gln Glu Pro Ser
485 490 495

His Phe Asp Ser Gln Gln Pro Ala Val Leu Glu Glu Glu Glu Val Met
500 505 510

Ile Ala His Ala His Pro Gln Glu Val Tyr Asn Glu Tyr Val Pro Arg
515 520 525

Gly Cys Lys Asn Lys Cys His Ser His Phe His Asp Thr Leu Gly Gln
530 535 540

Ser Asp Asp Leu Ile His His His His Asp Tyr His His Ile Leu His
545 550 555 560

His His His His Gln Asn His His Pro His Ser His Ser Gln Arg Tyr
565 570 575

Ser Arg Glu Glu Leu Lys Asp Ala Gly Val Ala Thr Leu Ala Trp Met
580 585 590

Val Ile Met Gly Asp Gly Leu His Asn Phe Ser Asp Gly Leu Ala Ile
595 600 605

Gly Ala Ala Phe Thr Glu Gly Leu Ser Ser Gly Leu Ser Thr Ser Val
610 615 620

Ala Val Phe Cys His Glu Leu Pro His Glu Leu Gly Asp Phe Ala Val
625 630 635 640

Leu Leu Lys Ala Gly Met Thr Val Lys Gln Ala Val Leu Tyr Asn Ala
645 650 655

Leu Ser Ala Met Leu Ala Tyr Leu Gly Met Ala Thr Gly Ile Phe Ile
660 665 670

Gly His Tyr Ala Glu Asn Val Ser Met Trp Ile Phe Ala Leu Thr Ala
675 680 685

Gly Leu Phe Met Tyr Val Ala Leu Val Asp Met Val Pro Glu Met Leu
690 695 700

His Asn Asp Ala Ser Asp His Gly Cys Ser Arg Trp Gly Tyr Phe Phe

705 710 715 720
 Leu Gln Asn Ala Gly Met Leu Leu Gly Phe Gly Ile Met Leu Leu Ile
 725 730 735
 Ser Ile Phe Glu His Lys Ile Val Phe Arg Ile Asn Phe
 740 745

<210> 3
 <211> 2229
 <212> DNA
 <213> Danio rerio

<400> 3
 atgatgacgt ttctttgcac acggtctggt cgccgtgcta gtggtgtgga gtgcagaatc 60
 gccgctgaac gcgcttactt tcgagtgcgt ggactcccgg ttgccaatat gattggctgg 120
 tggccacgcc tctgcccagt gatgtcactg gcactgctgt gggcgtgttc agtgggggcg 180
 ggttcagact gcaaactctgt ggccattgag actgacagcc gcatagcaga acaaacacag 240
 cagcgtcacc tacaggctct gttcgacaag tatggccaga acggcagcat ctccctagaa 300
 ggctctttca acctacttaa aggggtcggg cttgaccgca tccggaaagt gatggtgcat 360
 catcctggaa atgcccataa tcacacacac acgcatgata acacacacac tcatgtggac 420
 aaactcacgg cgcacacaca tccggtcacc accaagaagg gagacatgga tcacagcgtg 480
 gagaagagtg accctgtccc aaaagcacag ccagatcctg cctctgggaa gaaaagccag 540
 tcagatgcgc atcacaacct gtacatgaag atgaaccagg aatccaccac agctttgact 600
 acgccgtcat atgttaccag atcacggcgg accaatcgca gcgccgatta tgattttaca 660
 caggaccacg cctccttttag cccagtcag cccaatgtga cacactcaaa ccacacccat 720
 catgatgagg acacgcccac acaccagcat gatgaccatg atgagcacga acatgcccg 780
 gctagttag ggtgtcaaaa tgcctccacg atcctgcaga cgcattggcat gagaaaggaa 840
 gcaagtctct cagttaagga cttcagtttc ctctgccctg ctcttctcat gcagattgat 900
 tccaagtctt gcatcgtgca tgaagacgag gacgagcatt cagatcattc ccatcatcac 960
 aaacaccacc accatcatca tgatcaccaa cacctgcagc atccacataa ccacaccaat 1020
 ggaagaggcc agaggaacac tccagtctac atcgcatggc ttggagggtt tctctccatc 1080

actctgatca gtttgctggc gttggttggg gtggttttga tcccactcat gaacagagtt 1140
tgcttcaact tcctgctgag cttcctgggtg gcccttgagc tgggcactct gagcggagac 1200
gctctcctcc acctcatacc acattctcag ggtcatcacc atcacggcca ctctgaagag 1260
cacgctgaag aggaggactc ctttcgccct gtgtggaccg gactcacagc tctaagtgga 1320
gtttacatca tgttcctcat cgaacacttc ctgacccttg gcaaaatgta caaagacaaa 1380
aaccagaagg tgcagaagag ggttgatctc accacagaag ttttggagtc tgagaaactg 1440
ccatcattag aagaaaatga tgtcaaaatt gaagctgctg aaacgaatgg tgggcgtgca 1500
ctggcagagg aggaggaggt gatgttgggg gcggagctct acaacgacat agactgagag 1560
aacaaatgcc actcccactt ccatgacacg gtcggccaat cggatgagca gcatcatcat 1620
catcacgact accaccacat actgcatcat caaccactccc agaaccacca cccgcacaca 1680
cacacgcaca gacacacaca ctctactcg cagcagcact ttgagcaggc tgggtgtggc 1740
acactcgcct ggatgggtcat catgggagac ggactgcaca acttcagtga tggacttgcc 1800
ataggggcgg ctttcacaga aggtttgtcc agtggcttta gtacctcagt cgctgtgttc 1860
tgccatgagc ttcctcatga actcggatgat ttgcccgtcc tactgaaagc cggtatgtca 1920
gttcgacagg ccatgtgta taatctgctg tcagcactga tgggatatct gggcatgatc 1980
atcgggattc tcatcggaca ttatgctgaa aatgttgcca catggatctt tgctctcaca 2040
gctgggttat tcatgtacgt cgcgctcgtg gacatggtag ctgagatgct gcacaatgac 2100
gcgagcgaag caggtttcag tcactacggc ttcttcctcc tgcagaacgc tgggatactc 2160
ctaggcttcg gcatcatgct tatcattgct gtctttgagg acaggatcca actggactta 2220
ggttactga 2229

<210> 4
<211> 2744
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ctcgtgccga attcggcacg agaccgctg ttcgcgcctg gtagagattt ctcgaagaca 60

ccagtgggcc cgtgtggaac caaacctgcg cgcgtggccg ggccgtggga caacgaggcc 120
gcggagacga aggcgcaatg gcgaggaagt tatctgtaat cttgatcctg acctttgccc 180
tctctgtcac aaatcccctt catgaactaa aagcagctgc tttccccag accactgaga 240
aaattagtcc gaattgggaa tctggcatta atgttgactt ggcaatttcc acacggcaat 300
atcatctaca acagcttttc taccgctatg gagaaaataa ttctttgtca gttgaagggt 360
tcagaaaatt acttcaaat ataggcatag ataagattaa aagaatccat atacaccatg 420
accacgacca tcactcagac cacgagcatc actcagacca tgagcgtcac tcagaccatg 480
agcatcactc agaccacgag catcactctg accataatca tgctgcttct ggtaaaaata 540
agcgaaaagc tctttgcca gaccatgact cagatagttc aggtaaagat cctagaaaca 600
gccaggggaa aggagctcac cgaccagaac atgccagtgg tagaaggaat gtcaaggaca 660
gtgttagtgc tagtgaagtg acctcaactg tgtacaacac tgtctctgaa ggaactcact 720
ttctagagac aatagagact ccaagacctg gaaaactctt ccccaaagat gtaagcagct 780
ccactccacc cagtgtcaca tcaaagagcc gggtagccg gctggctggg aggaaaacaa 840
atgaatctgt gagtgagccc cgaaaaggct ttatgtattc cagaaacaca aatgaaaatc 900
ctcaggagtg tttcaatgca tcaaagctac tgacatctca tggcatgggc atccaggttc 960
cgctgaatgc aacagagttc aactatctct gtccagccat catcaaccaa attgatgcta 1020
gatcttgtct gattcataca agtgaaaaga aggctgaaat ccctccaaag acctattcat 1080
tacaaatagc ctgggttggg ggttttatag ccatttccat catcagtttc ctgtctctgc 1140
tgggggttat cttagtgcct ctcatgaatc ggggtgtttt caaatttctc ctgagtttcc 1200
ttgtggcact ggccgttggg actttgagtg gtgatgcttt ttacacctt ctccacatt 1260
ctcatgcaag tcaccacat agtcatagcc atgaagaacc agcaatggaa atgaaaagag 1320
gaccactttt cagtcatctg tcttctcaaa acatagaaga aagtgcctat ttgattcca 1380
cgtggaaggg tctaacagct ctaggaggcc tgtatttcat gtttcttgtt gaacatgtcc 1440
tcacattgat caaacaattt aaagataaga agaaaaagaa tcagaagaaa cctgaaaatg 1500
atgatgatgt ggagattaag aagcagttgt ccaagtatga atctcaactt tcaacaaatg 1560

aggagaaagt agatacagat gatcgaactg aaggctatitt acgagcagac tcacaagagc 1620
cctcccactt tgattctcag cagcctgcag tcttggaaga agaagaggtc atgatagctc 1680
atgctcatcc acaggaagtc tacaatgaat atgtaccagc agggtgcaag aataaatgcc 1740
attcacatit ccacgataca ctcggccagt cagacgatct cattcaccac catcatgact 1800
accatcatat tctccatcat caccaccacc aaaaccacca tcctcacagt cacagccagc 1860
gctactctcg ggaggagctg aaagatgccg gcgtcgccac tttggcctgg atggtgataa 1920
tggtgatgg cctgcacaat ttcagcgatg gcctagcaat tggtgctgct ttactgaag 1980
gcttatcaag tggtttaagt acttctgttg ctgtgttctg tcatgagttg cctcatgaat 2040
taggtgactt tgctgttcta ctaaaggctg gcatgaccgt taagcaggct gtcctttata 2100
atgcattgtc agccatgctg gcgtatcttg gaatggcaac aggaattttc attggtcatt 2160
atgctgaaaa tgtttctatg tggatatitg cacttactgc tggcttattc atgtatgttg 2220
ctctggttga tatggtacct gaaatgctgc acaatgatgc tagtgaccat ggatgtagcc 2280
gctgggggta tttcttttta cagaatgctg ggatgctttt gggttttgga attatgttac 2340
ttatttccat atttgaacat aaaatcgtgt ttcgtataaa tttctagtta aggtttaaat 2400
gctagagtag cttaaaaagt tgtcatagtt tcagtaggtc ataggagat gagtttgtat 2460
gctgtactat gcagcgttta aagttagtgg gttttgtgat ttttgtattg aatattgctg 2520
tctgttacia agtcagttaa aggtacgttt taatatitaa gttattctat cttggagata 2580
aaatctgtat gtgcaattca ccggtattac cagtttatta tgtaaacaag agatttggca 2640
tgacatgttc tgtatgtttc agggaaaaat gtctttaatg ctttttcaag aactaacaca 2700
gttattccta tactggatit taggtctctg aagaactgct ggtg 2744

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 5

cggaacagc gcgagtgtct tttgt

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 6

accgtgtgca aagaaacgtc atcat

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 7

cgcaaaaagc gagagtgtat tatgt

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 8

acggtctgca aacaaacgtg atgat

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 9

ctcaagggtt cagataaatc gtcct

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 10

gccatgttga ccccttaatg tgtcg

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 11

ctctaggatt cagataaaac gtgct

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 12

gccttgtaga ccccttaaag tgacg

25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> antisense sequence

<400> 13

gtccactcca gttactttca gggat

25

<210> 14

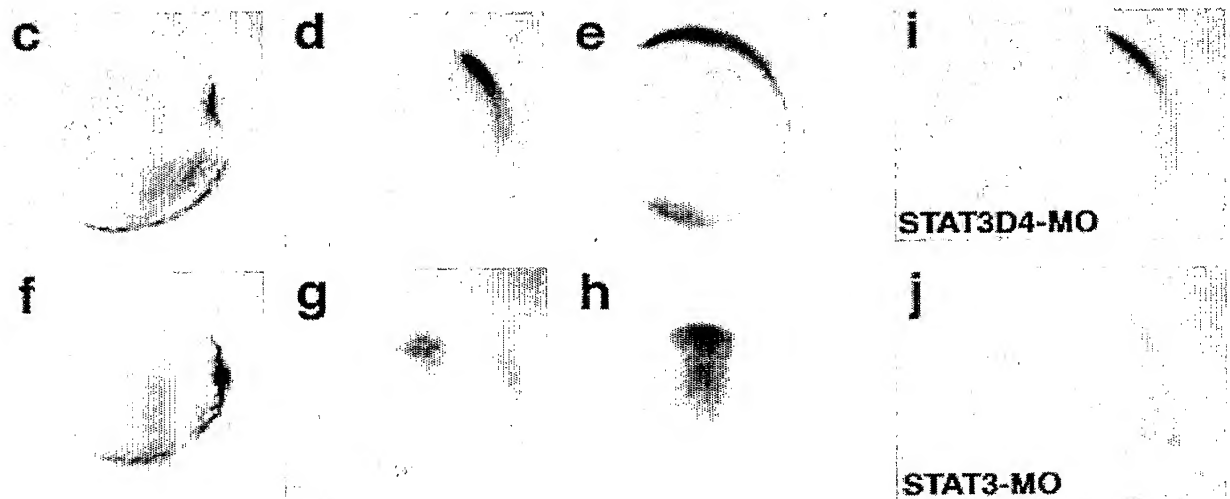
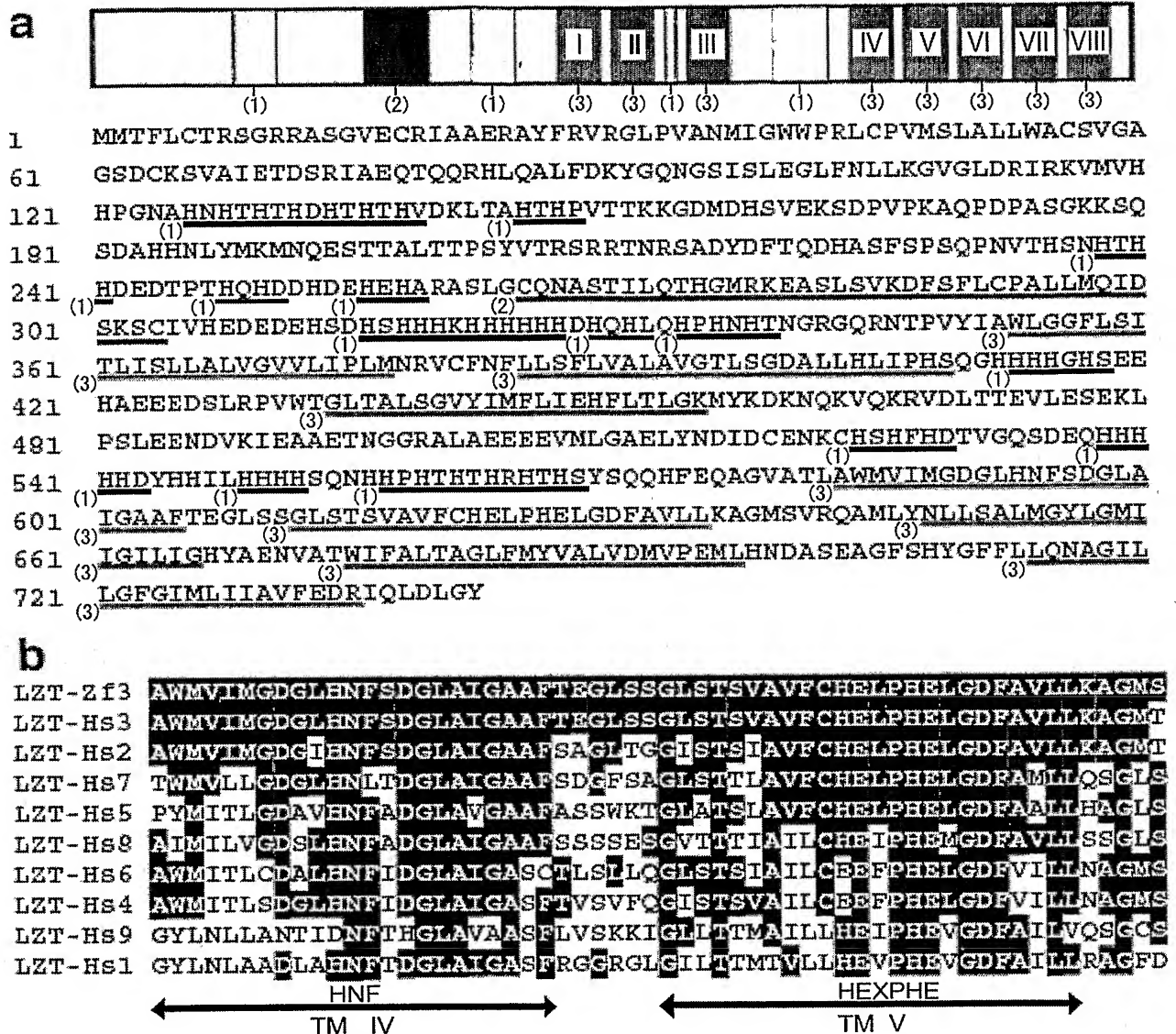
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> antisense sequence

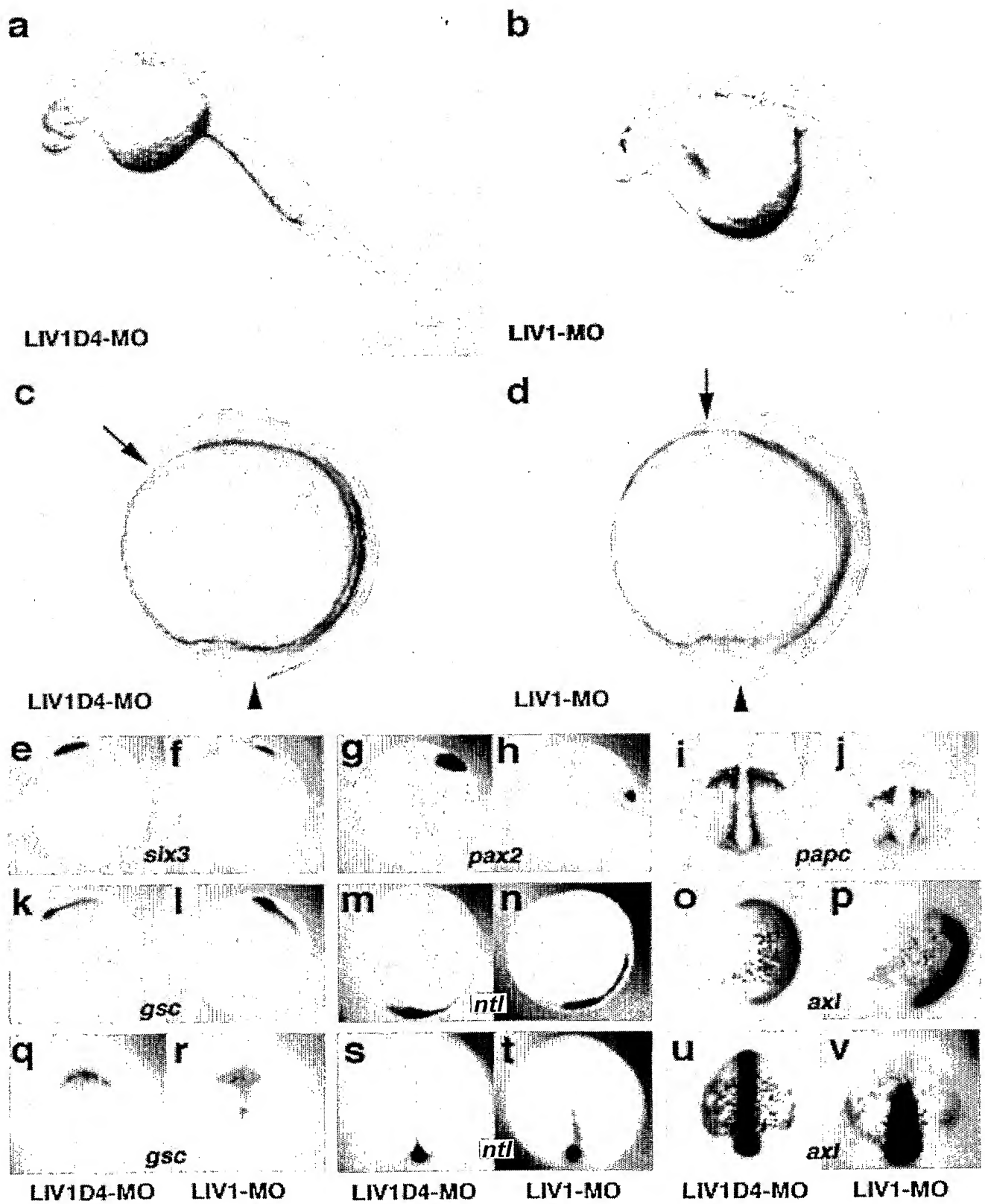
<400> 14
catgctgaac tctgaagttg atc

23

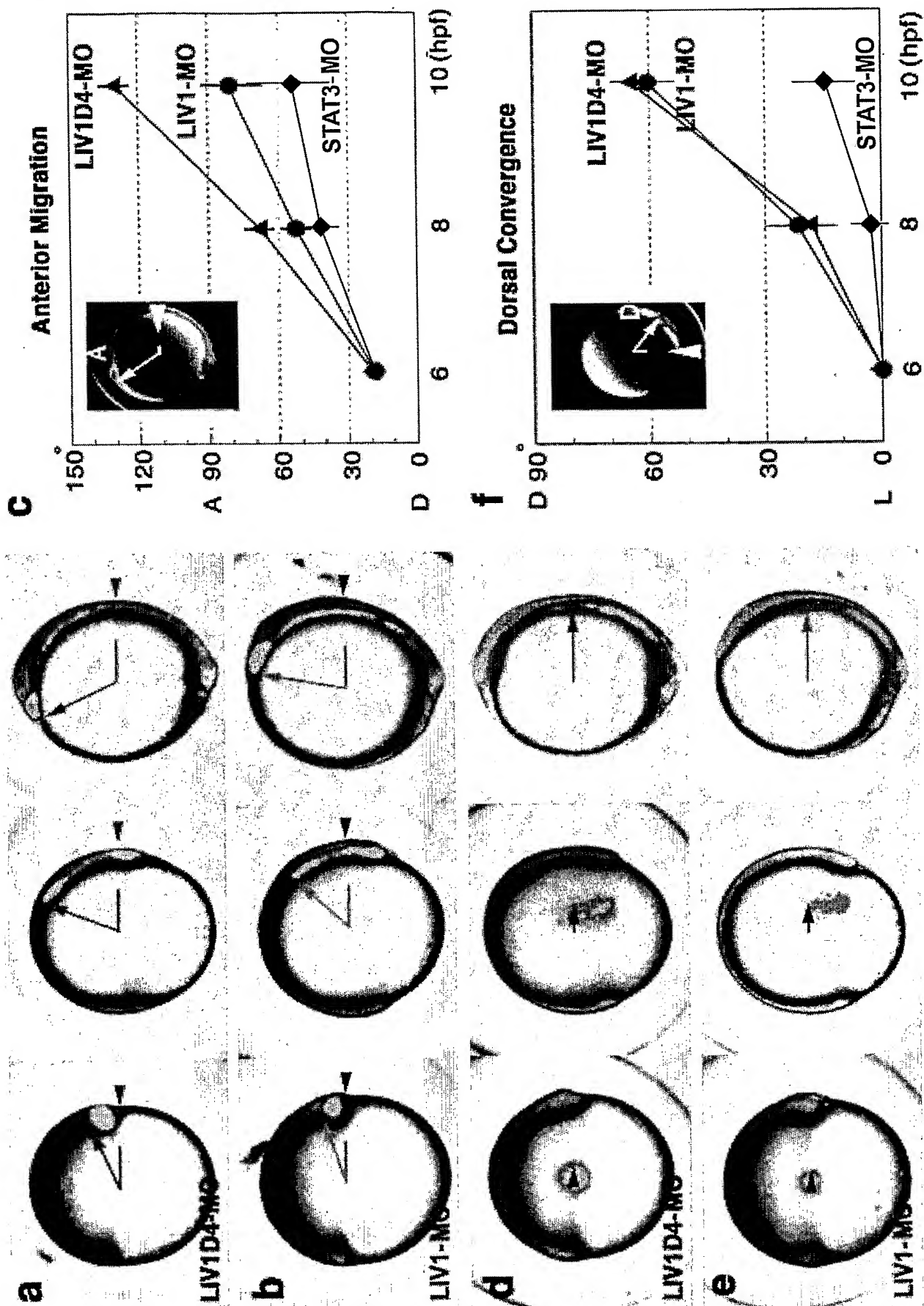
【書類名】 図面
【図 1】



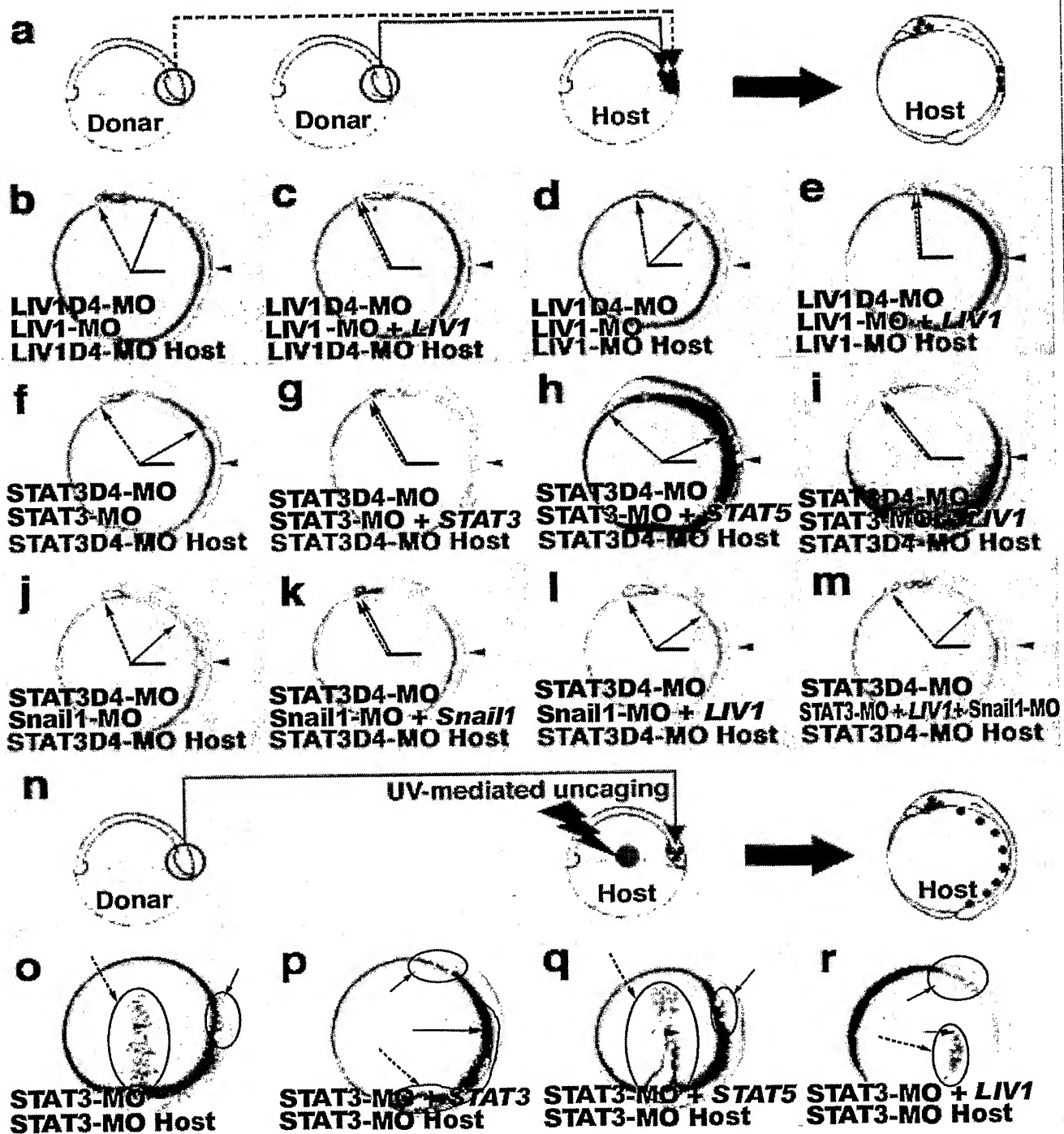
【図 2】



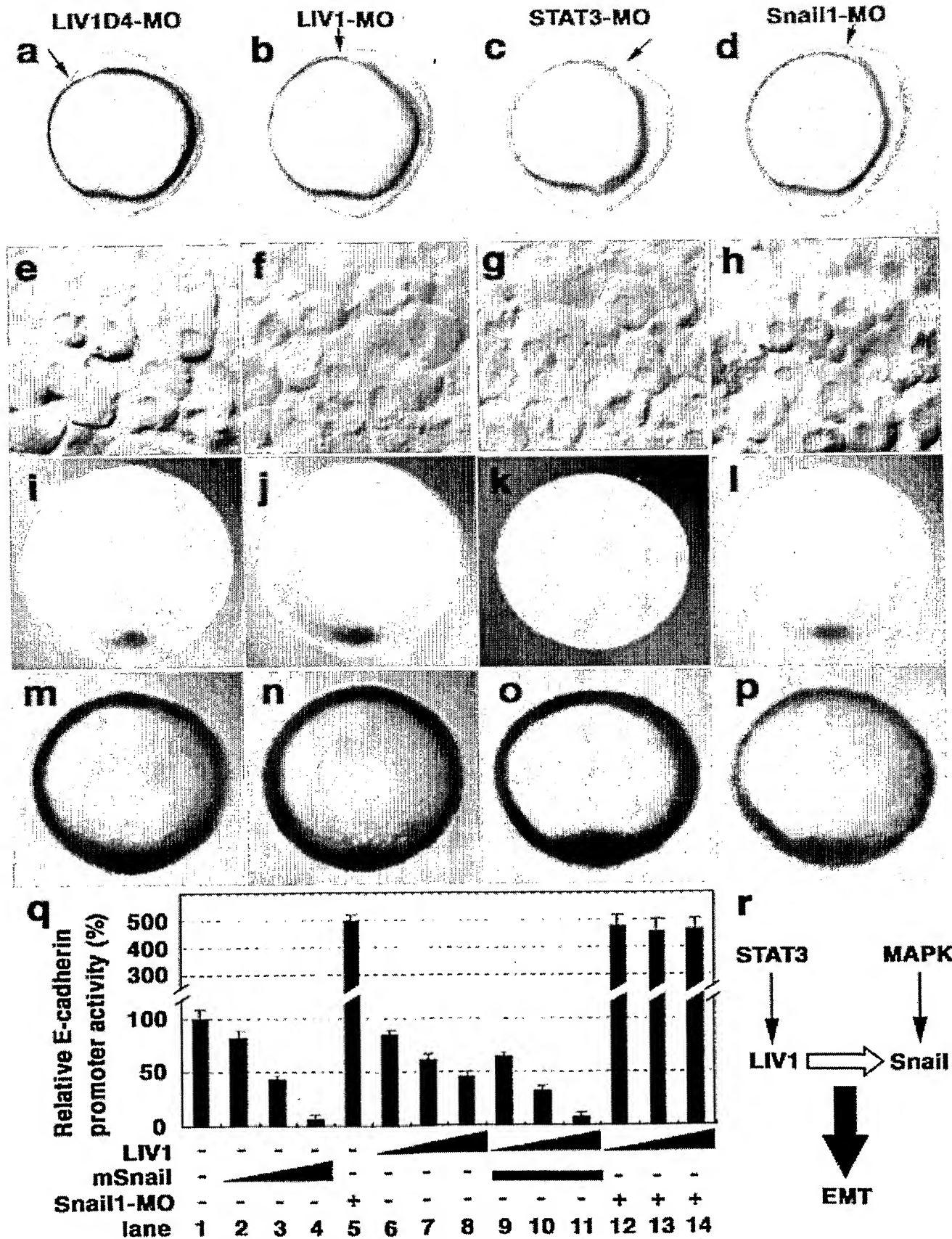
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 EMT調節剤および癌の新規治療用医薬品を提供することである。

【解決手段】 ゼブラフィッシュの胚を用いて、EMTにおいて重要な位置を占めると考えられるSTAT3の機構解明を試みた。STAT3標的遺伝子は、意外にも亜鉛トランスポーターLIV1であった。EMTにおけるSTAT3とLIV1の関係について検討を重ね、さらに、EMTとの関連が知られているジンクフィンガータンパク質Snailとの関係についても検討した。その結果、STAT3により発現調節を受けるLIV1は、Snail活性化を通じて最終的にEMTを誘導することがわかった。LIV1は、EMT調節剤として利用可能である。また、EMTは癌の進行に関連することからLIV1 アンチセンスヌクレオチド等は癌の治療薬として利用できる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 3 5 1 2 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 2 6 4 0 3 8]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 1 0 月 3 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市住之江区安立 2 - 7 - 6

氏 名

平野 俊夫